

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年10 月20 日 (20.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/097217 A1

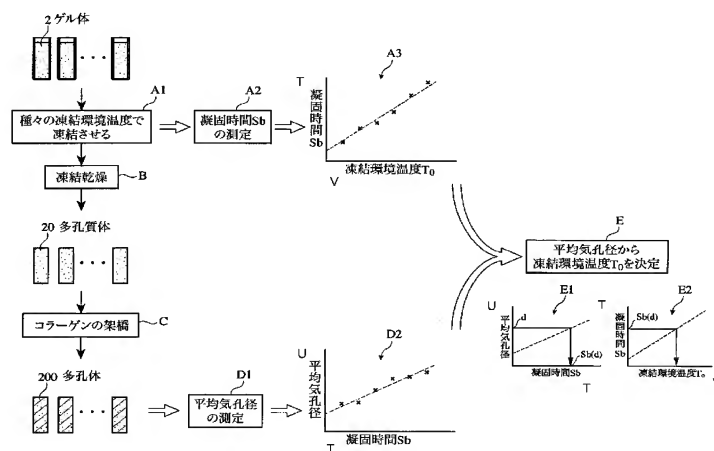
- (51) 国際特許分類: A61L 27/00  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005271  
(22) 国際出願日: 2005 年3 月23 日 (23.03.2005)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2004-100765 2004 年3 月30 日 (30.03.2004) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ペンタックス株式会社 (PENTAX CORPORATION) [JP/JP]; 〒1748639 東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6-9 Tokyo (JP). 独立行政法人物質・材料研究機構 (NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 Ibaraki (JP).  
(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 庄司 大助 (SHOJI,

Daisuke) [JP/JP]; 〒1748639 東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6-9 ペンタックス株式会社内 Tokyo (JP). 河村 克己 (KAWAMURA, Katsumi) [JP/JP]; 〒1748639 東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6-9 ペンタックス株式会社内 Tokyo (JP). 中島 武彦 (NAKAJIMA, Takehiko) [JP/JP]; 〒1748639 東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6-9 ペンタックス株式会社内 Tokyo (JP). 田中 順三 (TANAKA, Junzo) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 菊地 正紀 (KIKUCHI, Masanori) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 生駒 俊之 (IKOMA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現 1 丁目 2-1 独立行政法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 望月 直美 (MOCHIZUKI, Naomi) [JP/JP]; 〒1748639 東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6-9 ペンタックス株式会社内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CONTROLLING AVERAGE PORE DIAMETER OF POROUS MATERIAL CONTAINING APATITE/COLLAGEN COMPOSITE FIBER

(54) 発明の名称: アパタイト/コラーゲン複合体繊維を含む多孔体の平均気孔径制御方法



A1... FREEZE AT VARIED FREEZING ENVIRONMENT TEMP.  
A2... MEASURE COAGULATION TIME Sb  
B... LYOPHILIZE  
C... CROSSLINK COLLAGEN  
D1... MEASURE AV. PORE DIAM.  
E... DETERMINE FREEZING ENVIRONMENT TEMP.  $T_0$  FROM AV. PORE DIAM.  
T... COAGULATION TIME Sb  
U... AV. PORE DIAM.  
V... FREEZING ENVIRONMENT TEMP.  $T_0$   
2... GEL  
20... POROUS BODY  
200... POROUS MATERIAL

(57) Abstract: With respect to a process for producing a porous material containing apatite/collagen composite fiber through gelation of a dispersion containing an apatite/collagen composite fiber, collagen and water, freezing or drying of the obtained gel into a porous body and crosslinking of the collagen of the porous body, there is provided a method comprising controlling the average pore diameter of the porous material by a gel coagulation time during the freezing operation.

[続葉有]

WO 2005/097217 A1



(74) 代理人: 高石橘馬 (TAKAISHI, Kitsuma); 〒1620825  
東京都新宿区神楽坂6丁目67神楽坂F Nビル5階  
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: アパタイト／コラーゲン複合体繊維と、コラーゲンと、水とを含む分散物をゲル化した後、得られたゲル体を凍結及び乾燥することにより多孔質体とし、多孔質体中のコラーゲンを架橋することによりアパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体を製造する過程において、凍結の工程におけるゲル体の凝固時間により、多孔体の平均気孔径を制御する方法。

## 明 細 書

### アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体の平均気孔径制御方法 技術分野

[0001] 本発明は人工骨材、細胞の足場材等に好適なアパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体(以下、単に「アパタイト／コラーゲン多孔体」という)に関し、特にアパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径を制御する方法に関する。

### 背景技術

[0002] アパタイトからなる人工骨は自家骨に対する親和性を有し、自家骨に直接結合することができるため、その有用性が評価されており、整形外科、脳神経外科、形成外科、口腔外科等で臨床応用されている。しかしアパタイトのようなセラミックス系の人工骨の機械的特性及び生理的性質は、自家骨と全く同じ訳ではない。例えばアパタイトのみからなるいわゆるセラミックス系人工骨は、自家骨より硬くて脆い。また自家骨は吸収と再生という代謝を繰り返すのに対し、アパタイトからなる人工骨は生体内でほとんど溶解しないため、生体内に半永久的に残存する。このため残存した人工骨が、人工骨と自家骨との界面で自家骨を破壊し、骨折の原因となることが懸念されている。

[0003] 近年、アパタイト人工骨より自家骨の組成に近く、生体内で分解する人工骨が研究されている。例えば特表平11-513590号(特許文献1)は、ハイドロキシアパタイトにコラーゲン及び必要に応じてその他のバインダーが結合したネットワークを含む多孔体を開示している。この多孔体は生体分解性を有するので、多孔体内に自家骨が形成されるとともに、多孔体自身は体内に吸収される。そのため、この多孔体は脊椎固定、骨欠損の補填、骨折修復及び周欠損移植に利用できる。

[0004] アパタイトとコラーゲンからなる多孔体の機械的強度と生体親和性はほぼ反比例の関係にあり、機械的強度を大きくするほど生体親和性は小さくなるという傾向がある。このため、用途に応じたバランスでこれらの特性を有するように多孔体を設計したいという要望がある。アパタイトとコラーゲンからなる多孔体の特性は気孔率にある程度依存し、多孔体の気孔率は、原料中の液体(水、リン酸水溶液等)の割合等により制御

可能である。しかし人工骨の用途は多岐に渡ってきており、用途に拠る望ましい特性の違いも大きくなっているため、気孔率の制御のみでは十分とは言えない。

[0005] 機械的強度や生体親和性は、アパタイトとコラーゲンからなる多孔体の気孔率のみならず、平均気孔径にも依存することが知られている。例えば多孔体の平均気孔径が大きいほど、生体に埋入したときに気孔内に体液、組織等が入り込み易いので、多孔体は大きな生体親和性を有すると言える。平均気孔径はアパタイトとコラーゲンからなる多孔体の特性に大きな影響を与える因子であり、多孔体が所望の大きさの平均気孔径を有するようにしたいという要望は、近年一層高まってきている。しかし、平均気孔径を制御してアパタイトとコラーゲンからなる多孔体を作製する方法は未だ知られていない。

[0006] 特許文献1:特表平11-513590号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 従って本発明の目的は、アパタイト／コラーゲン多孔体を製造する工程において、アパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径を制御する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 上記目的に鑑み鋭意研究の結果、本発明者らは、アパタイト／コラーゲン複合体繊維及びコラーゲンを含むゲル体を凍結及び乾燥し、得られた多孔質体を架橋してなるアパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径は、ゲル体の凍結に要する時間に依存することを発見し、本発明に想到した。

[0009] すなわち本発明の多孔体の平均気孔径制御方法は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維と、コラーゲンと、水とを含む分散物をゲル化した後、得られたゲル体を凍結及び乾燥することにより多孔質体とし、前記多孔質体中のコラーゲンを架橋することによりアパタイト／コラーゲン多孔体を製造する過程において、前記凍結の工程における前記ゲル体の凝固時間により、前記多孔体の平均気孔径を制御することを特徴とする。

[0010] 前記凍結のために前記ゲル体を保持する温度により、前記ゲル体の凝固時間を制御するのが好ましい。前記ゲル体を保持する温度は $-100\sim 0^{\circ}\text{C}$ とするのが好ましく、

−90〜0℃とするのがより好ましく、−80〜−20℃の間でほぼ一定の温度とするのが特に好ましい。

### 発明の効果

[0011] 本発明の方法は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維と、コラーゲンと、水とを含む分散物のゲル体を凝固させる時間により、得られるアパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径を制御するものである。凝固時間はゲル体を凍結させるために保持する環境の温度、すなわち凍結環境温度に依存するので、予め凝固時間と凍結環境温度との関係を求めておけば、アパタイト／コラーゲン多孔体を作製する際に所定の温度でゲル体を凝固させるだけで、所望の平均気孔径を有するものを得られる。このように凍結環境温度のみによって生成物の平均気孔径を制御しうる方法は、非常に簡便であると言える。

[0012] アパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径は、その多孔体の機械的強度及び生体親和性に影響する。従って所望の平均気孔径を有するアパタイト／コラーゲン多孔体を作製し得る本発明の方法は、人工骨材、細胞の足場材等に用いる多孔体の作製に有用である。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]温度センサを挿入したゲル体を示す断面図である。

[図2]凍結工程における多孔体の温度変化を概略的に示すグラフである。

[図3]本発明のアパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径制御方法を示すフローチャートである。

[図4]アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-1)、(b-1)及び(c-1)の凍結環境温度に対するゲル体の凝固時間を示すグラフである。

[図5]アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-1)、(b-1)及び(c-1)の走査電子顕微鏡(SEM)写真である。

[図6]アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-2)、(b-2)及び(c-2)の凍結環境温度に対するゲル体の凝固時間を示すグラフである。

[図7]アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-2)、(b-2)及び(c-2)の走査電子顕微鏡(SEM)写真である。

[図8]凝固時間に対する平均気孔径を示すグラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

[0014] 本発明のアパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径制御方法は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維と、バインダーとなるコラーゲンを含む分散物をゲル化した後、得られたゲル体を凍結し、コラーゲンを架橋するアパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体の製造工程において、ゲル体を凍結する時間を制御することにより、所望の平均気孔径を有する多孔体を作製するものである。そこで、まずアパタイト／コラーゲン多孔体の製造方法を説明し、次にゲル体の凍結工程における平均気孔径制御を説明する。

[0015] [1] アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体の製造方法

(1) アパタイト／コラーゲン複合体繊維

(a) 原料

アパタイト／コラーゲン複合体繊維は、コラーゲン、リン酸又はその塩、カルシウム塩を原料とする。コラーゲンとしては特に限定されず、動物等から抽出したものを使用できる。なお由来する動物の種、組織部位、年齢等は特に限定されない。一般的には哺乳動物（例えばウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ネズミ）や鳥類（例えばニワトリ）の皮膚、骨、軟骨、腱、臓器等から得られるコラーゲンが使用できる。また魚類（例えばタラ、ヒラメ、カレイ、サケ、マス、マグロ、サバ、タイ、イワシ、サメ）の皮、骨、軟骨、ひれ、うろこ、臓器等から得られるコラーゲン様蛋白を使用してもよい。なおコラーゲンの抽出方法は特に限定されず、一般的な抽出方法を用いることができる。また動物組織から抽出されたコラーゲンに限定されず、遺伝子組み替え技術によって得られたものを使用してもよい。

[0016] リン酸又はその塩（以下単に「リン酸（塩）」という）としてはリン酸、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウムが挙げられる。またカルシウム塩としては炭酸カルシウム、酢酸カルシウム、水酸化カルシウムが挙げられる。リン酸塩及びカルシウム塩はそれぞれ均一な水溶液又は懸濁液の状態で添加するのが好ましい。

[0017] 使用するアパタイト原料（リン酸（塩）及びカルシウム塩）とコラーゲンとの質量比によ

り、生成物中のアパタイト／コラーゲンの質量比を制御できる。このため使用するアパタイト原料とコラーゲンとの質量比は、目的とするアパタイト／コラーゲン複合体繊維の組成比により適宜決定する。アパタイト／コラーゲン複合体繊維中のアパタイト／コラーゲンの比率は9／1～6／4とするのが好ましく、例えば8／2とする。

[0018] (b) 溶液の調製

リン酸(塩)水溶液及びカルシウム塩水溶液を調製する。リン酸(塩)水溶液及びカルシウム塩水溶液の濃度は、リン酸(塩)とカルシウム塩とが所望の配合比となる限り特に限定されないが、後述する滴下操作の都合上、リン酸(塩)水溶液の濃度を50～250 mM程度とし、カルシウム塩水溶液の濃度を200～600 mM程度とするのが好ましい。コラーゲンは、一般的にはリン酸水溶液の状態で前述のリン酸(塩)水溶液に加える。コラーゲンのリン酸水溶液としては、コラーゲンの濃度が約0.5～1質量%、リン酸の濃度が10～30 mM程度のものを使用する。実用的にはコラーゲンの濃度が0.8～0.9質量%(例えば0.85質量%)、リン酸の濃度が15～25 mM(例えば20 mM)程度である。

[0019] (c) アパタイト／コラーゲン複合体繊維の製造

添加すべきカルシウム塩水溶液の量とほぼ同量の水を予め反応容器に入れ、40℃程度に加熱しておく。そこに、コラーゲンを含有するリン酸(塩)水溶液とカルシウム塩水溶液を滴下する。滴下条件を制御することにより、合成するアパタイト／コラーゲン複合体繊維の長さを制御できる。コラーゲンを含有するリン酸(塩)水溶液とカルシウム塩水溶液の滴下を並行し、滴下速度は10～50 ml/min程度とするのが好ましい。反応溶液は50～300 rpm程度で攪拌するのが好ましい。滴下中、反応溶液中のカルシウムイオン濃度を3.75 mM以下、かつリン酸イオン濃度を2.25 mM以下に維持するのが好ましい。カルシウムイオン濃度及びリン酸イオン濃度をこの範囲に保つことにより、反応溶液のpHは8.9～9.1に保たれる。カルシウムイオン及び／又はリン酸イオンの濃度が上記範囲を超えると、複合体の自己組織化が妨げられる。本明細書中「自己組織化」とは、コラーゲン繊維に沿って、ハイドロキシアパタイト(アパタイト構造を有するリン酸カルシウム)が生体骨特有の配向をとること、すなわちハイドロキシアパタイトのC軸がコラーゲン繊維に沿うように配向することを意味する。上述の滴下条件によ

り、アパタイト／コラーゲン複合体繊維の長さは、多孔体の原料として好適な1mm以下となる。またアパタイト／コラーゲン複合体繊維は、自己組織化したものとなる。

[0020] 滴下終了後、スラリー状になった水とアパタイト／コラーゲン複合体繊維との混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥は、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下に凍結した状態で真空引きし、急速に乾燥させることにより行うことができる。

[0021] (2) アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む分散物の調製

アパタイト／コラーゲン複合体繊維に水、リン酸水溶液等の液体を加えて攪拌し、ペースト状の分散物を調製する。アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む分散物中の液体の割合が80～99体積％となるように液体の添加量を決定するのが好ましく、90～97体積％とするのがより好ましい。製造する多孔体の気孔率 $P$ は分散物中のアパタイト／コラーゲン複合体繊維と液体との体積比に依存し、下記式(1)：

$$P = X / (X+Y) \quad \cdots (1)$$

(ただし、 $X$ は分散物中のアパタイト／コラーゲン複合体繊維の体積を示し、 $Y$ は分散物中の液体の体積を示す。)により表される。このため加える液体の量によって多孔体の気孔率 $P$ を決定することができる。液体を加えた後、得られた分散物を攪拌するのが好ましい。分散物を十分に攪拌することにより、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を切断して繊維長の分布幅を大きくし、作製する多孔体の強度を大きくすることができる。

[0022] 複合体の分散物にバインダーとなるコラーゲンを加え、さらに攪拌する。コラーゲンの添加量は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維100質量％に対して、1～10質量％とするのが好ましく、3～6質量％とするのがより好ましい。複合体の場合と同様に、リン酸水溶液の状態でコラーゲンを加えるのが好ましい。コラーゲンのリン酸水溶液の濃度等は特に限定されないが、実用的にはコラーゲンの濃度が0.8～0.9質量％(例えば0.85質量％)、リン酸の濃度が15～25 mM(例えば20 mM)である。

[0023] (3) 分散物のゲル化

コラーゲンのリン酸(塩)水溶液の添加により分散物は酸性となっているので、これにpHが7程度となるまで水酸化ナトリウム溶液を加える。分散物のpHを6.8～7.6とするのが好ましく、7.0～7.4とするのがより好ましい。分散物のpHを6.8～7.6とすることに



より、バインダーとして加えたコラーゲンの繊維化を促進することができる。

[0024] 分散物にリン酸緩衝溶液 (PBS) の2.5〜10倍程度の濃縮液を加えて攪拌し、イオン強度を0.2〜0.8に調整する。より好ましいイオン強度は、PBSと同程度のイオン強度 (0.2〜0.8程度) である。分散物のイオン強度を大きくすることにより、バインダーとして加えたコラーゲンの繊維化を促進することができる。

[0025] 分散物を成形型に入れた後、35〜43℃の温度に保持することにより分散物をゲル化させる。分散物の温度を35〜43℃に保持することにより、バインダーとして加えたコラーゲンが繊維化し、分散物がゲル状となる。保持温度は35〜40℃とするのが好ましい。分散物を十分にゲル化させるため、保持する時間は0.5〜3.5時間とするのが好ましく、1〜3時間とするのがより好ましい。分散物をゲル化させることにより、アパタイト/コラーゲン複合体繊維が分散物中で沈降するのを防ぐことができるため、均一な多孔質体を製造することが可能となる。ゲル化処理を施した分散物はゼリー状になる。

[0026] (4) ゲル体の凍結及び乾燥

アパタイト/コラーゲン複合体繊維を含むゲル体を凍結器で凍結させる。目的とするアパタイト/コラーゲン多孔体の平均気孔径は、ゲル体の凍結に要する時間に依存する。平均気孔径の制御方法については、後で詳細に説明する。凍結器内の温度は−100〜0℃とするのが好ましく、−100〜−10℃とするのがより好ましく、−80〜−20℃とするのが特に好ましい。−100℃未満であると、得られるアパタイト/コラーゲン多孔体の平均気孔径が小さ過ぎる。0℃超であると、凍結しないか凍結に時間がかかり過ぎる上、多孔体の平均気孔径が大き過ぎる。

[0027] 凝固したゲル体を凍結乾燥し、多孔質体とする。凍結乾燥は、アパタイト/コラーゲン複合体繊維の場合と同様に、−10℃以下に凍結した状態で真空引きし、急速に乾燥させることにより行う。凍結乾燥は分散物が十分に乾燥するまで行えばよく時間は特に制限されないが、一般的には24〜72時間程度である。

[0028] (5) コラーゲンの架橋

コラーゲンの架橋はγ線、紫外線、熱脱水、電子線等を用いた物理的架橋、架橋剤や縮合剤を用いた化学的架橋等いずれの方法を用いてもよい。化学的架橋の場合

合、架橋剤の溶液に凍結乾燥した多孔質体を浸すことにより、多孔質体中のコラーゲンを架橋する。架橋剤としては、例えばグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド等のアルデヒド系架橋剤、ヘキサメチレンジイソシアネート等のイソシアネート系架橋剤、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等のカルボジイミド系架橋剤、エチレングリコールジエチルエーテル等のポリエポキシ系架橋剤、トランスグルタミナーゼが挙げられる。これらの架橋剤のうち、架橋度の制御し易さや、得られる多孔体の生体適合性の面でグルタルアルデヒドが特に好ましい。

[0029] グルタルアルデヒドによって架橋する場合、調製するグルタルアルデヒド溶液の濃度は0.005〜0.015質量%とするのが好ましく、0.005〜0.01質量%とするのがより好ましい。多孔体は脱水する必要があるが、グルタルアルデヒド溶液の溶媒としてエタノール等のアルコールを使用すると、多孔体の脱水をコラーゲンの架橋と同時に行うことができる。脱水を架橋と同時に行うことにより、アパタイト／コラーゲン複合体繊維が収縮した状態で架橋反応を起こさせ、生成する多孔体の弾性を向上させることができる。

[0030] 架橋処理後、未反応のグルタルアルデヒドを除去するため2質量%程度のグリシン水溶液に多孔体を浸漬し、次いで水洗する。さらにエタノールに浸漬することにより多孔体を脱水した後、室温で乾燥させる。

[0031] 熱脱水架橋の場合、凍結乾燥後の多孔質体を100〜160℃、0〜100 hPaの真空オーブン中に10〜12時間保持すればよい。

[0032] [2] アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体の平均気孔径制御方法

アパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含むゲル体を凍結させる時間に依存する。このため平均気孔径を制御するには、先ずゲル体を凍結させる条件(凍結環境温度及び凝固時間)と、生成するアパタイト／コラーゲン多孔体の平均気孔径との関係を調べる必要がある。

[0033] (1) 凍結環境温度 $T_0$ と凝固時間 $S_b$

図1に示すように、円柱状の成形型1に入ったゲル体2の中心部に温度センサ3を挿入する。この成形型1を凍結器に入れ、ゲル体2が凝固するまで保持する。図2は、凍結器に入れたゲル体の温度の時間変化を概略的に示すグラフである。凍結器の

温度は $T_0$ ℃に設定してある。

[0034] 図2に示すように、凍結器に入れるとゲル体の温度は室温から急速に低下し(Sa)、ある温度に達すると、その後は一定となるか緩やかに下降(Sb)する。このようにゲル体の温度が一定又は緩やかな下降を示している間に、ゲル体は凝固する。本明細書中、ゲル体が凝固中であって、温度変化が一定又は緩やかな下降を示す時間を凝固時間(Sb)といい、その間の温度( $t$ ℃)を凝固温度という。また凍結させるためにゲル体を保持する環境の温度(例えば凍結器の温度)を凍結環境温度 $T_0$ という。完全に凝固した後、ゲル体の温度は凍結環境温度 $T_0$ になるまで下がる(Sc)。

[0035] 凝固時間Sbは、凍結環境温度 $T_0$ により制御することができる。例えば直径1〜2cm、高さ3〜5cmの円柱状ゲル体の場合、凍結環境温度 $T_0$ を $-80^{\circ}\text{C}$ とすると凝固時間Sbは300〜500秒になり、凍結環境温度 $T_0$ を $-20^{\circ}\text{C}$ とすると、凝固時間Sbは3000〜3500秒になる。凍結環境温度 $T_0$ は一定でなくてもよいが、温度変化を $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 以内に保つと、凝固時間Sbを制御し易いので好ましい。

[0036] 図3に示すように、複数のゲル体2を種々の凍結環境温度 $T_0$ で凍結させ(工程A1)、各ゲル体2の凝固時間Sbを測定する(工程A2)。これにより、凍結環境温度 $T_0$ に対する凝固時間Sbを示すグラフ(A3)を作成することができる。凝固時間Sbは凍結環境温度 $T_0$ にほぼ比例する。図3に示す例では凍結環境温度 $T_0$ に対する凝固時間Sbのグラフは直線状であるが、ゲル体2の形状や組成によっては曲線になることもある。信用性のために3点以上の凍結環境温度 $T_0$ で凝固時間Sbを測定し、グラフ化するのが好ましい。グラフが曲線になる場合は、4点以上の凍結環境温度 $T_0$ で測定するのが好ましい。

[0037] (2) 凝固時間Sbと平均気孔径

凍結乾燥(工程B)により得られた多孔質体20をコラーゲン架橋(工程C)した後、得られた多孔体200の平均気孔径を測定(工程D1)する。温度センサ3から0〜10 mmのところにある気孔のうち3つ以上の径を測定し、その平均を求めるのが好ましい。種々の凝固時間Sbで得たアパタイト／コラーゲン多孔体200の平均気孔径を測定することにより、凝固時間Sbに対する平均気孔径のグラフ(D2)を作成することができる。多孔体の平均気孔径は線インターセプト法により求めることができる。具体的には、

先ず多孔体200の研磨面を顕微鏡写真に撮り、写真にランダムに直線を引く。次にこの直線が横切る全ての気孔の内径を測定し、その平均値を求める。平均気孔径は凝固時間 $S_b$ にほぼ比例し、凝固時間 $S_b$ が短いほど平均気孔径は小さく、凝固時間 $S_b$ が長いほど平均気孔径は大きい。図3に示す例では凝固時間 $S_b$ に対する平均気孔径のグラフは直線状であるが、曲線状になることもある。

[0038] (3) 平均気孔径制御方法

凝固時間 $S_b$ と平均気孔径のグラフ(D2)及び凍結環境温度 $T_0$ と凝固時間 $S_b$ のグラフ(A3)を用いて、所望の平均気孔径を有するアパタイト／コラーゲン多孔体を作製するための凍結環境温度 $T_0$ を求めることができる。例えば平均気孔径 $d \mu m$ のアパタイト／コラーゲン多孔体を作製するには、凝固時間 $S_b$ と平均気孔径のグラフから平均気孔径 $d \mu m$ に対応する凝固時間 $S_b(d)$ を求め(工程E1)、凍結環境温度 $T_0$ と凝固時間 $S_b$ のグラフから凝固時間を $S_b(d)$ にするための凍結環境温度 $T_0$ を求める(工程E2)。このようにして、所望の平均気孔径を有するアパタイト／コラーゲン多孔体を作製するためのゲル体の凍結環境温度 $T_0$ を決定することができる(工程E)。

[0039] 例えば直径1〜2cmの円柱状多孔体を作製する場合、平均気孔径を $100 \mu m$ にするには凝固時間 $S_b$ を450〜500秒にする必要があるので、凍結環境温度 $T_0$ を $-85^{\circ}C$ 〜 $-75^{\circ}C$ に設定する。平均気孔径を $350 \mu m$ にするには凝固時間 $S_b$ を2700〜3000秒にする必要があるので、凍結環境温度 $T_0$ を $-40^{\circ}C$ 〜 $-30^{\circ}C$ に設定すればよい。このように凍結環境温度 $T_0$ を $-80^{\circ}C$ 〜 $-10^{\circ}C$ にすることにより凝固時間 $S_b$ を200〜3500秒とし、多孔体の平均気孔径を $50 \sim 500 \mu m$ にすることができる。

実施例

[0040] 本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

[0041] 実施例1

(1) アパタイト／コラーゲン複合体繊維の作製

120 mMリン酸水溶液400 mlに、コラーゲンのリン酸水溶液(濃度0.97 wt%、20 mMリン酸)を412 g加えて攪拌することにより溶液Iを得た。他方、400 mM水酸化カルシウム溶液(溶液II)を400 ml調製した。反応容器に200 mlの純水を入れた後、溶液I及び

IIを同時に滴下した。滴下中、反応溶液を攪拌し、溶液I及びIIの滴下速度をコントロールして反応溶液のpHを8.9〜9.1に保持した。生成したアパタイト／コラーゲン複合体繊維の長さは、概ね1〜2mmであった。アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含むスラリーは、凍結及び凍結乾燥した。アパタイト／コラーゲン複合体繊維中のアパタイト／コラーゲンの配合比は、質量基準で8／2であった。

[0042] (2) アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体(a-1) の作製

乾燥したアパタイト／コラーゲン複合体繊維2gに純水4.84 mlを加えた後、1NのNaOH水溶液0.06 mlを加えて攪拌した。得られたアパタイト／コラーゲン複合体繊維のスラリーにコラーゲンのリン酸水溶液(濃度0.97 wt%、20 mMリン酸)を2g加えて攪拌した後、10倍濃縮のPBSを1.61 ml加えて攪拌し、分散物を得た。液体(純水、リン酸水溶液、NaOH、PBS)の添加量は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む分散物の95体積%であった。

[0043] 分散物を成形型(スチロール製、円柱形、内径1.5 cm×高さ3.5 cm)に入れ、37℃で2時間保持してゼリー状の成形体(a)を得た。この成形体(a)の中心に温度センサを入れ、−80℃に設定した凍結器内に入れた。成形体(a)の凝固温度は−5〜−1℃であり、凝固時間は350秒であった。得られた凝固体を真空オーブン(0〜240℃、760〜1 Torr)を用いて乾燥した後、減圧(1.33 hPa)、140℃で熱脱水架橋することにより、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-1)を得た。

[0044] (3) アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体(b-1) 及び(c-1) の作製

ゼリー状成形体(a)と同じ形状及び組成の成形体(b) 及び(c) をそれぞれ−50℃、−20℃に設定した凍結器内に入れた以外、実施例1(1)及び(2)と同様にして、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(b-1) 及び(c-1) を得た。成形体(b)の凝固時間は1609秒であり、成形体(c)の凝固時間は3240秒であった。凝固温度はいずれも−5〜−1℃であった。多孔体(a-1)、(b-1)及び(c-1)の気孔率は、いずれも約95%であった。多孔体(a-1)、(b-1)及び(c-1)の凍結環境温度 $T_0$ (凍結器内の温度)と凝固時間 $S_b$ との関係を図4に示す。凝固時間 $S_b$ は凍結環境温度 $T_0$ にほぼ比例していた。

[0045] (4) 平均気孔径の測定

アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-1)、(b-1)及び(c-1)の断面の走査電子顕微鏡(SEM)写真を図5に示す。線インターセプト法により、各多孔体の平均気孔径を求めたところ、表1に示すとおりであった。なお気孔径は、温度センサから約7mm離れたところにある気孔のものを測定した。凝固時間を短くするほど平均気孔径は小さくなり、凝固時間を長くするほど平均気孔径は大きくなっていった。

[表1]

多孔体 No.	凍結環境温度 $T_0$ (°C)	凝固時間 $S_b$ (秒)	平均気孔径 ( $\mu\text{m}$ )	
				標準偏差
(a-1)	-80	350	93	53
(b-1)	-50	1609	181	92
(c-1)	-20	3240	378	142

## [0046] 実施例2

原料の配合量を表2のとおりとした以外実施例1(1)〜(3)と同様にして、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体(a-2)、(b-2)及び(c-2)を得た。いずれの多孔体も、凝固温度は-5〜-1°Cであった。

[0047] [表2]

例No.	アパタイト／コラーゲン複合体繊維	水	NaOH溶液 (1 N)	コラーゲンの リン酸水溶液	PBS	液体の 添加量 <sup>注</sup>
実施例 1	2 g	4.84 ml	0.06 ml	2 g	1.61 ml	95 体積%
実施例 2	4 g	9.86 ml	0.12 ml	4 g	1.529 ml	90 体積%

注：液体の添加量は、アパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む分散物に対する純水、リン酸水溶液、NaOH水溶液及びPBSの合計の体積比を示す。

[0048] 多孔体(a-2)、(b-2)及び(c-2)の凍結環境温度 $T_0$ (凍結器内の温度)と凝固時間 $S_b$ との関係を図6に示す。実施例1と同様に、凝固時間 $S_b$ は凍結環境温度 $T_0$ にほぼ比例していた。多孔体(a-2)、(b-2)及び(c-2)の断面の走査電子顕微鏡(SEM)写真を図7に示す。図7から、気孔率90%の多孔体(a-2)、(b-2)及び(c-2)は、気孔率95%

のもの(実施例1)と比較して太い梁部分を有することが分かった。線インターセプト法により、各多孔体の平均気孔径を求めたところ、下記表3のとおりであった。

[0049] [表3]

多孔体 No.	凍結環境温度T <sub>0</sub> (°C)	凝固時間S <sub>b</sub> (秒)	平均気孔径 (μm)	
				標準偏差
(a-2)	-80	835	97	71
(b-2)	-50	1439	330	150
(c-2)	-20	3388	619	411

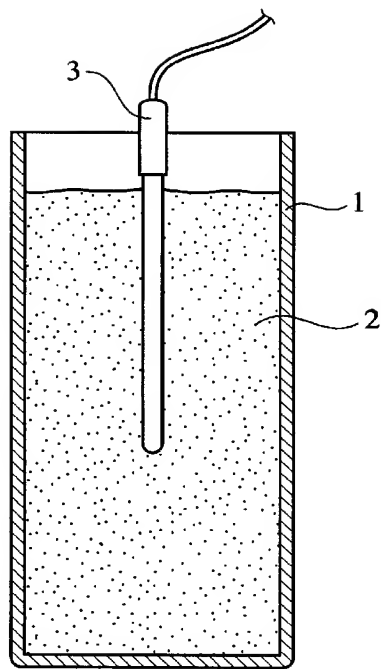
[0050] 実施例1及び2における多孔体製造時の凝固時間S<sub>b</sub>と、平均気孔径との関係を図8に示す。アパタイト/コラーゲン複合体繊維を含有する多孔体の平均気孔径は、成形体の凝固時間S<sub>b</sub>にほぼ比例していた。また平均気孔径/凝固時間S<sub>b</sub>のグラフの傾きは、気孔率90%(実施例2)の時の方が気孔率95%の時(実施例1)より大きかった。これは同じ凝固時間であれば、凝固する水の量が少ないほど氷の結晶成長時間が長く、各氷を収容する気孔の径が大きくなるためであると考えられる。図4、6及び8に示すグラフを用いることにより、所望の平均気孔径を有する多孔体を作製することが可能であった。

### 請求の範囲

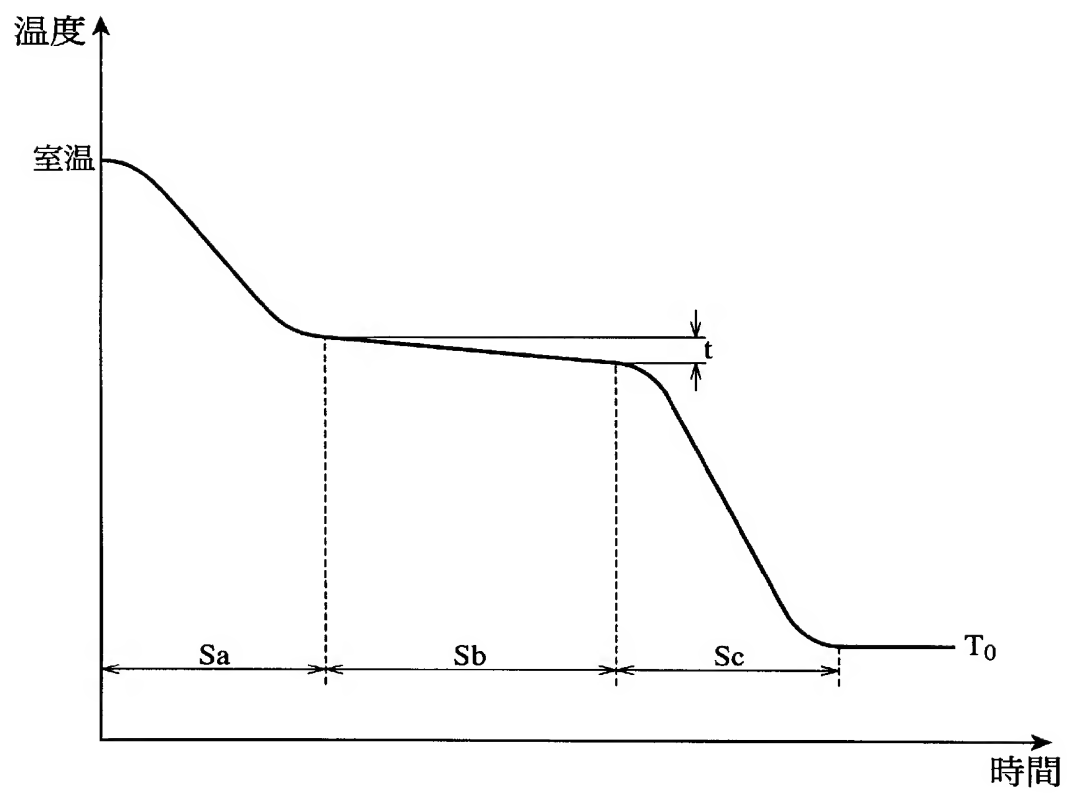
- [1]      アパタイト／コラーゲン複合体繊維と、コラーゲンと、水とを含む分散物をゲル化した後、得られたゲル体を凍結及び乾燥することにより多孔質体とし、前記多孔質体中のコラーゲンを架橋することによりアパタイト／コラーゲン複合体繊維を含む多孔体を製造する過程において、前記凍結の工程における前記ゲル体の凝固時間により、前記多孔体の平均気孔径を制御することを特徴とする方法。
- [2]      請求項1に記載の平均気孔径制御方法において、前記凍結のために前記ゲル体を保持する温度により、前記ゲル体の凝固時間を制御することを特徴とする方法。
- [3]      請求項1又は2に記載の平均気孔径制御方法において、前記凍結のために前記ゲル体を保持する温度を $-100\sim 0^{\circ}\text{C}$ とすることを特徴とする方法。



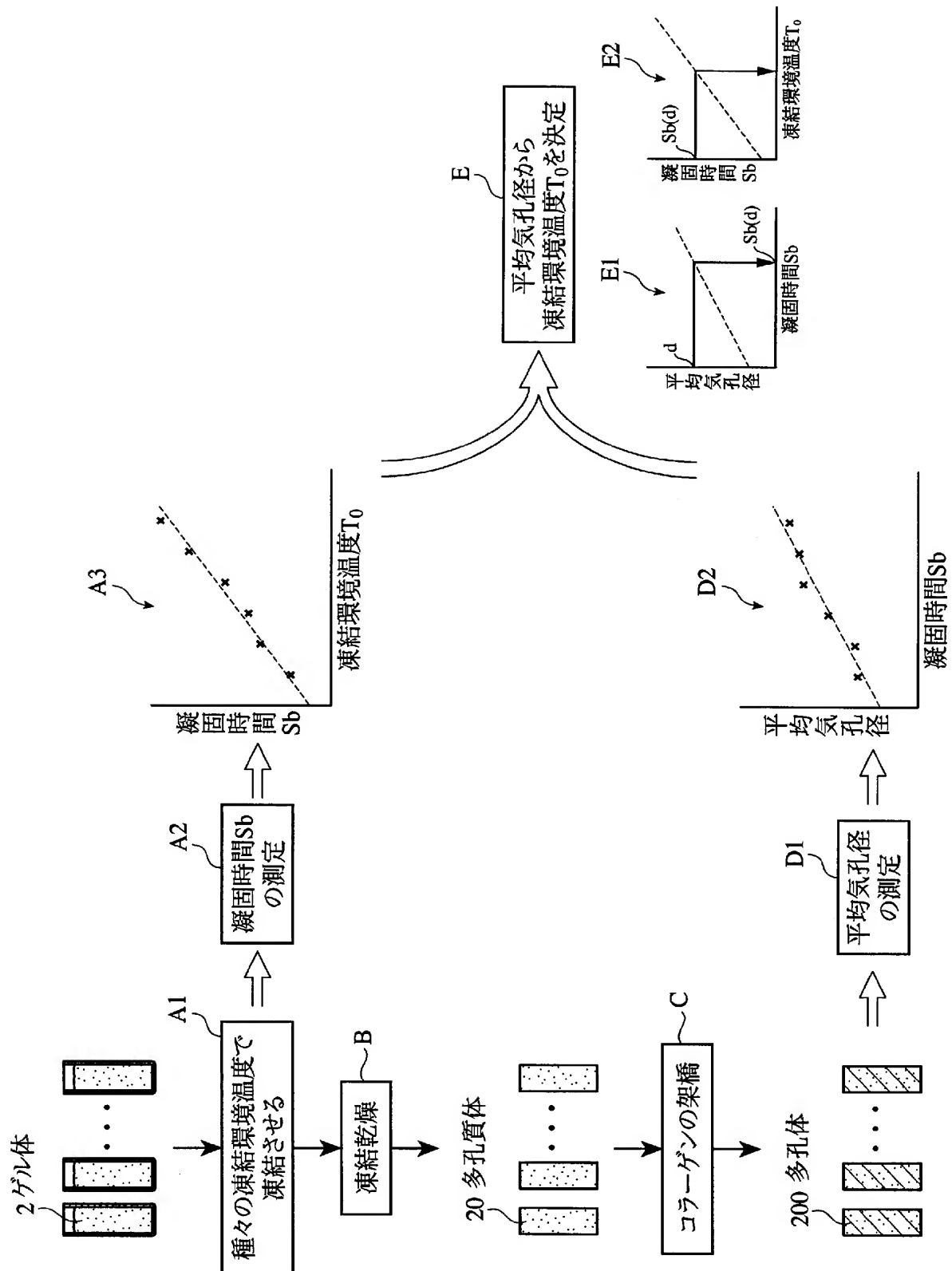
[図1]



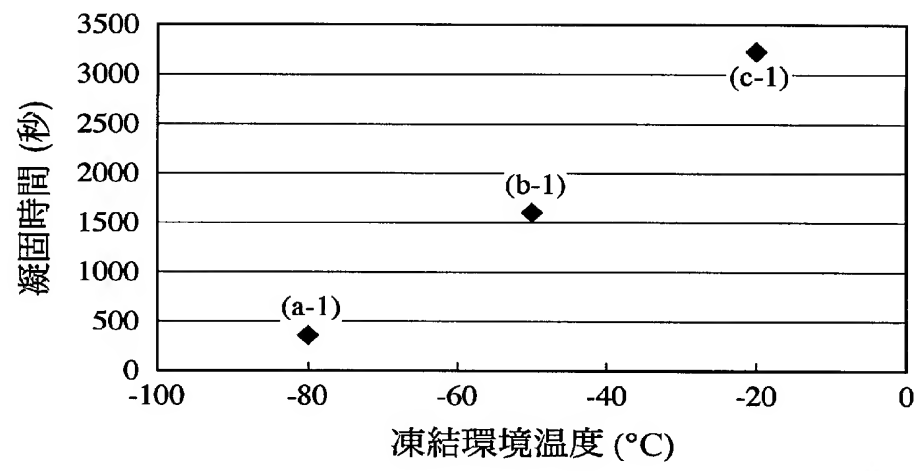
[図2]



[図3]

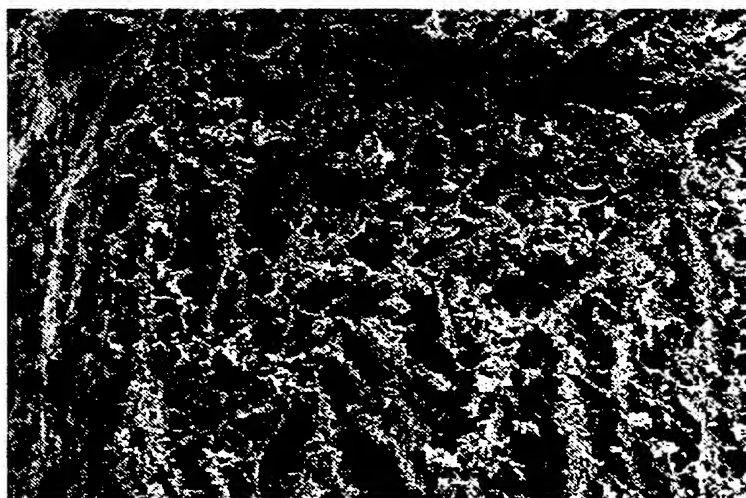


[図4]



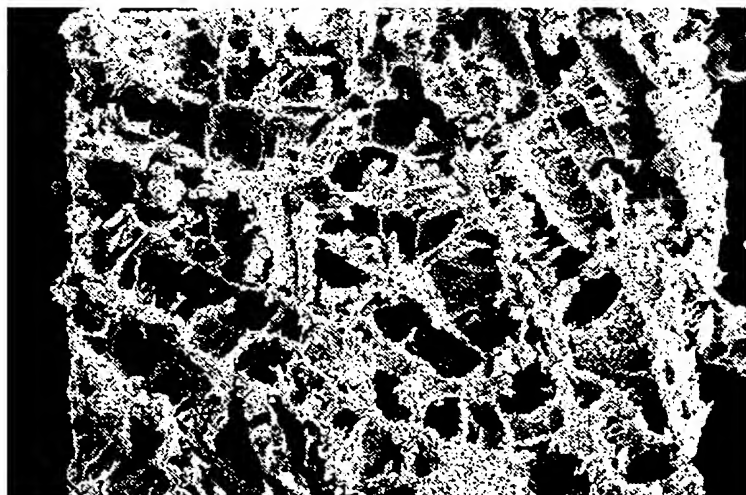
[図5]

(a-1)



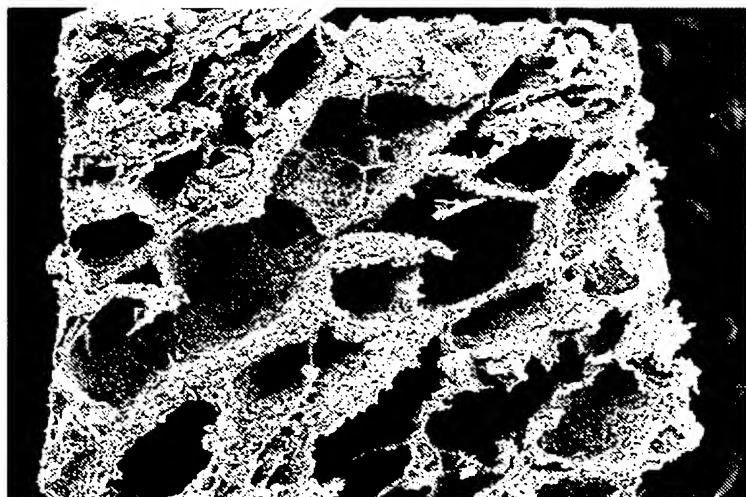
750 μm

(b-1)



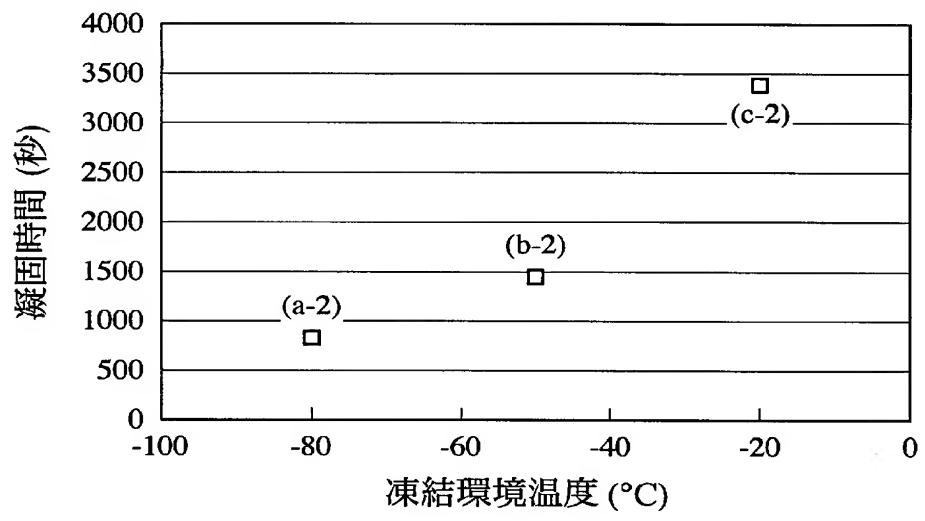
750 μm

(c-1)



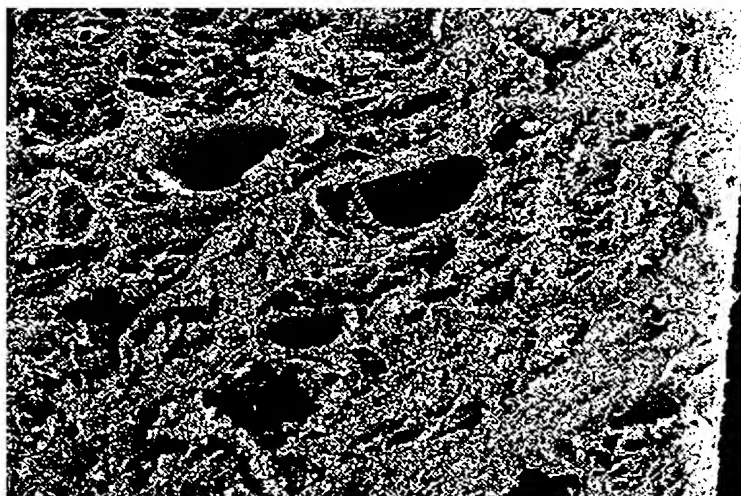
750 μm

[図6]

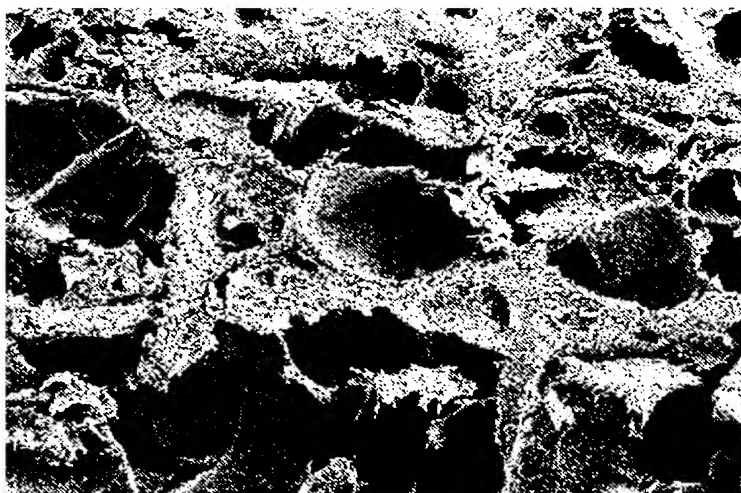


[図7]

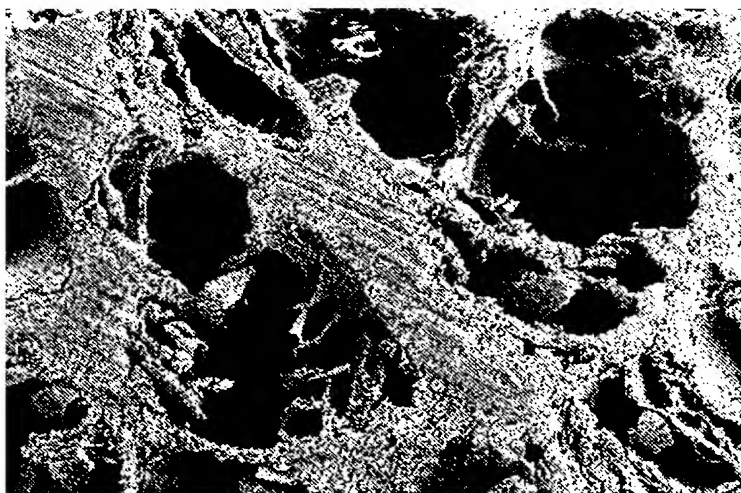
(a-2)



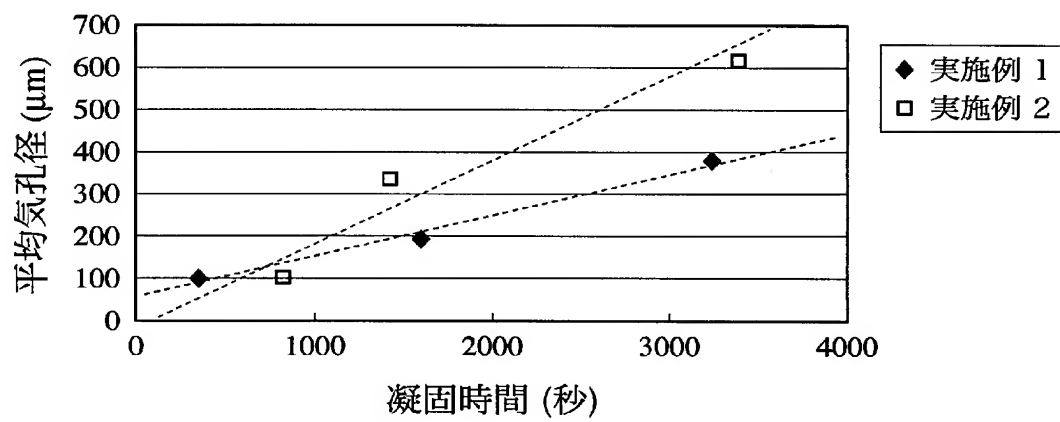
(b-2)



(c-2)



[図8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005271

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIKUCHI, M. et al., Porous body preparation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites for bone tissue regeneration, Key Engineering Materials, 24 December, 2003 (24.12.03), 254-256 (Bioceramics), 561-564	1-3
Y	JP 11-513590 A (ORQUEST INC.), 24 November, 1999 (24.11.99), Full text & WO 97/14376 A1	1-3
Y	JP 2-265935 A (Nitta Gelatin Inc.), 30 October, 1990 (30.10.90), Page 1, lower right column, line 15 to page 2, upper left column, line 13 (Family: none)	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April, 2005 (26.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005271

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/092759 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 13 November, 2003 (13.11.03), Claims; page 11, lines 15 to 24 (Family: none)	1-3
E,X	GELINSKY, M. et al., Porous scaffolds made from mineralized collagen - a biomimetic bone graft material, Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 01 April, 2004 (01.04.04), 35(4), 229-233, (ABSTRACT), CAPLUS AN:2004: 429562	1-3
E,X	WO 2004/041320 A1 (Independent Administrative Institution National Institute for Materials Science), 21 May, 2004 (21.05.04), Full text (Family: none)	1-3

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61L27/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST ファイル (JOIS) MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KIKUCHI, M. et al., Porous body preparation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites for bone tissue regeneration, Key Engineering Materials, 2003.12.24, 254-256 (Bioceramics), 561-564	1-3
Y	JP 11-513590 A (オーケスト インコーポレイテッド) 1999.11.24, 全文 & WO 97/14376 A1	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

9829

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2-265935 A (新田ゼラチン株式会社) 1990. 10. 30, 第 1 頁右下欄 1 5 行ー第 2 頁左上欄 1 3 行 (ファミリーなし)	1-3
Y	WO 03/092759 A1 (科学技術振興事業団) 2003. 11. 13, 請求の範囲, 第 1 1 頁 1 5ー2 4 行 (ファミリーなし)	1-3
E, X	GELINSKY, M. et al., Porous scaffolds made from mineralized collagen - a biomimetic bone graft material, Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2004. 4. 1, 35(4), 229-233 (ABSTRACT) CAPLUS AN:2004:429562	1-3
E, X	WO 2004/041320 A1 (独立行政法人物質・材料研究機構) 2004. 05. 21, 全文 (ファミリーなし)	1-3